

## 培養心筋細胞の電氣的活動に対する dinitrophenol と cyanide の作用

曲 瑞 瑤\*, 田中 淳二, 豊田 弘子, 松村 幹郎

ニワトリ胚 (12日~14日齢) より得た心室筋を 3 日~12日間培養し, 心室筋細胞の電氣的活動に対する代謝阻害剤の作用を検討した. 培養心筋細胞は, 直径  $50\sim300\mu\text{m}$  の集団を作って自発拍動を繰り返しており, 自発性と電氣的性質との両面に対する代謝阻害の影響を明らかにすることが可能である. dinitrophenol および cyanide は, 自発性活動の頻度を増加する. しかし, 正常 Tyrode 液において高い頻度の自発性活動を持つ細胞に対しては, 反対に自発性活動の頻度を減少する. 自発活動の頻度が増加するとき, 拡張期の細胞内電位は約 20 mV 減少し, ペースメーカ電位の勾配が急峻になる. 活動電位の立ち上がり速度は減少し, オーバーシュートは低下し, 特に, その持続時間が短縮する. プラトー相は低下し遂には消失する. これらの変化をもたらす原因としては, 代謝阻害剤によって  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  能動輸送が抑制され, 細胞内の  $\text{K}^+$  の喪失および  $\text{Na}^+$  の蓄積によること,  $\text{Ca}^{2+}$  能動輸送の抑制による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が関与していること, また, 細胞内 ATP 濃度の減少することなどが考察された.

(平成 7 年 9 月 28 日採用)

## Effects of 2,4-Dinitrophenol and Cyanide on the Electrical Activities of the Cultured Chick Embryonic Heart Cells

Rui-Yao QU\*, Junji TANAKA, Hiroko TOYOTA and Moto MATSUMURA

The intracellular membrane potential of cultured ventricular cells from 12- to 14-day-old chick embryos was measured. The cultured cells aggregated together to form clusters of 50 to 300  $\mu\text{m}$  in diameter and continued spontaneous beating. Moreover, they were free from autonomic innervation. On these grounds, the cultured cells were proper materials for investigation of the nature of not only electrical properties but also of the spontaneous activities of the heart muscle. When the culture dish was perfused with a Tyrode solution containing 0.25 mM DNP or 2 mM NaCN, the rate of the spontaneous activities of most of the cells was accelerated, whereas that of a few cells which were beating at the original rate of as high as 200/min was decelerated. When the rate increased, the maximum diastolic potential

川崎医科大学生理学教室  
〒701-01 倉敷市松島577

\* 北京市首都医科大学の研修生

Department of Physiology, Kawasaki Medical School : 577  
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

Visiting Research Associate from the Capital University of  
Medical Sciences under the Fellowship of Kawasaki Medical  
School

Present Address : Department of Physiology, Capital Institute  
of Medical Sciences, Beijing China

was elevated by around 20 mV and the pacemaker potential became steeper. The recordings also showed slowing of the rising phase, decrease in overshoot and, especially, shortening of the action potential. Detailed measurement of the action potential duration indicated that these chemicals shortened the action potential duration at the level of 20% repolarization ( $APD_{20}$ ) more markedly than they did that at the level of 90% repolarization ( $APD_{90}$ ). At a high concentration of NaCN, repolarization was performed in an all-or-none manner. These changes in action potential configuration resulted from inhibition of  $Na^+K^+$  active transport. However, a rise in the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration during diastole can't be excluded as a cause of the action potential shortening. A fall in the intracellular ATP level should be also considered.

We discuss the clinical significance of the increase in the activity rates and action potential shortening, because these factors both prevent further damage of myocardial cells and maintain circulation readjustment. (Accepted on September 28, 1995)

*Kawasaki Igakkaishi* 21(2): 61-69, 1995

**Key Words** ① Cultured chick embryonic cardiomyocytes

② Metabolic inhibitor

③ Dinitrophenol

④ Cyanide

## 緒 論

心臓組織の電気的活動は、低酸素状態および代謝阻害剤によって顕著に影響され、その最も特徴的な変化は活動電位持続時間の短縮である<sup>1)</sup>。代謝阻害の結果もたらされる現象として、(1)  $Na^+K^+$  ポンプの抑制とそれに由来する膜電位の変化、(2) 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇、(3) 細胞内 ATP 濃度や cAMP レベルの低下、(4) pH の低下、(5) 上記の変化によって二次的に起こるイオン透過性の変化、イオンチャネルの性質の変化、 $Na^+$  や  $K^+$  の平衡電位の変化などを挙げることができる。

しかし、代謝阻害剤はその種類や濃度、また実験試料によって必ずしも同一の作用を示すとは限らない。たとえば、dinitrophenol (DNP) は洞結節の活動頻度を最初上昇した後減少する<sup>2)</sup> のに対して、カエルの灌流心臓に対しては常にその拍動を減少し遂には停止することが報告されている<sup>3)</sup>、また、DNP がノルアドレナリンの分泌作用を介して間接的に拍動性や収縮性に影響を与えることも指摘されている<sup>3)</sup>。

既に Clusin<sup>4)</sup>、Hasin & Barry<sup>5)</sup> は培養心筋細胞に代謝阻害剤を作用させたときの、膜電流の変化、膜の脱分極、および  $K^+$  の流入を記録測定している。しかし、活動電位の短縮やペースメーカー電位の変化についての十分な記述はない。本研究においては、ニワトリ胚より得た培養心室筋細胞を用い、ミトコンドリアにおける酸化の磷酸化を阻害する代表的毒物である DNP および cyanide (CN) を与えて、拍動数およびペースメーカー電位や活動電位のプラトー相などの電気的活動に及ぼす影響を検討した。培養心筋細胞は心室筋であって自発的活動を繰り返しており、ペースメーカーに対する作用を測定することができること、また、2~5層の薄い層の集団を作っているので薬物の拡散が速やかであること、神経終末を含まないので代謝阻害剤の心筋細胞に対する直接作用を調べることができること、などの利点があると考えられる。

## 方 法

培養心筋細胞の作製：1) ニワトリ胚 (12~14 日齢) より心臓を無菌的に摘出する。2) 磷酸緩

衡液 (PBS) 内で十分に血液を洗いおとし、心室のみを約  $0.5 \times 3$  mm の大きさに細断する。3) 心室の細片を三角フラスコ内に入れ、これに 0.2 % トリプシン-PBS を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 100 r.p.m. で 50~60 分間攪拌分離する。4) 上清の細胞分散液のみをとり、これを 1,500 r.p.m. で 10 分間遠心分離する。次に上清を捨て、沈澱した細胞に培養液を添加する。5)  $1 \times 10^6$  個/dish に分注し、 $37^{\circ}\text{C}$  にて  $\text{CO}_2$  インキュベータ (5 %  $\text{CO}_2$ -air) 内で 3~14 日培養する。なお、培養液は 3~4 日ごとに新鮮液と交換した。

培養心筋細胞の作製に用いた溶液の組成は次のとおりである (mM)。

Ca, Mg を含まない PBS: NaCl 137, KCl 2.7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5.

トリプシン-PBS: PBS + 0.2 % Trypsin.

MEN 液: NaCl 116, KCl 5.4,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.9,  $\text{MgSO}_4$  0.8,  $\text{CaCl}_2$  1.8, 10 %  $\text{NaHCO}_3$  適量を加え、 $\text{pH}=7.4$  に滴定、グルコース 5.5, アミノ酸, 抗生物質, 10 % 牛胎児血清 (大日本製薬) を加える。

#### 実験装置の配列

倒立顕微鏡 (TMD, ニコン) の架台に温度調節装置 (DM-MPIO, 北里サプライ) をおき、その上に培養皿をおいた。温度調節された Tyrode 液を培養皿より約 30 cm 高い位置において常に灌流し、培養皿内の温度は常に  $33^{\circ}\text{C}$  に一定に保たれた。培養心筋細胞は直径 0.2~0.5 mm の集団を作って自発拍動を続けており、その集団の中の 1 個の細胞内に微小ガラス電極 (電極抵抗は 10~50 M $\Omega$ ) を刺入して膜電位を導出した。陰極線オシロスコープ面に表示して観察しながらデータレコーダー (RD-120T, TEAC) に記録し、熱ペン記録計に再生して記録した。

代謝阻害剤としては DNP (Sigma) および NaCN (WAKO) を用いた。これらの代謝阻害剤を含む Tyrode 液をやはり培養皿より 30 cm 上方におき、三方活栓によって正常 Tyrode 液と切り替えて、培養皿内を灌流した。灌流の速度は 5~7 ml/分である。

また代謝阻害剤の影響の検討は、活動電位持

続時間の各相での変化を指標として行った。活動電位の各相での持続時間を表すために、最大拡張期電位を 100, オーバーシュートの棘を 0 としてその間を 10 等分し、それぞれのレベルにおける持続時間を測定した。ここでは、20, 30, 40, 50 および 90 のレベルにおける持続時間を  $\text{APD}_{20-50}$ ,  $\text{APD}_{90}$  として表現した。

#### 統計学的処理

代謝阻害剤の影響の検討は、代謝阻害剤負荷前と負荷後の各相で paired  $t$  検定にて検定を行い、 $p < 0.05$  以下を有意とした。

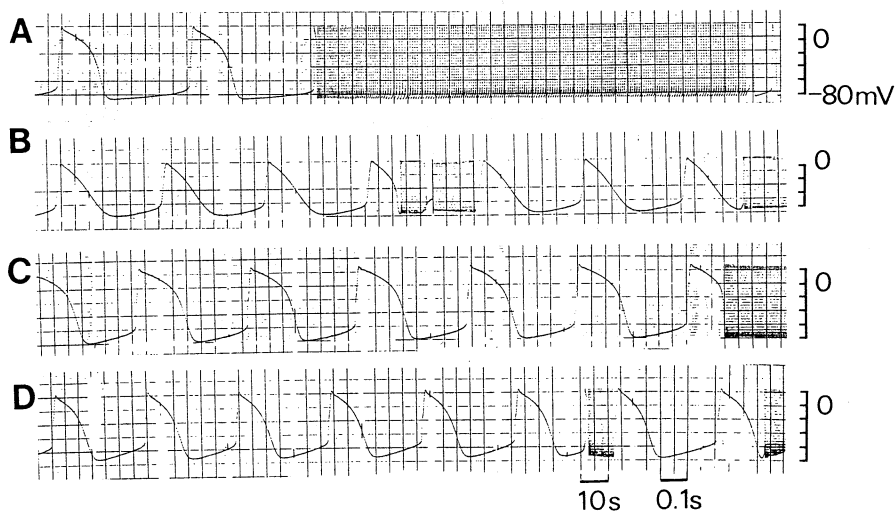
## 結 果

### 1. 拍動リズムおよびペースメーカー電位に対する作用

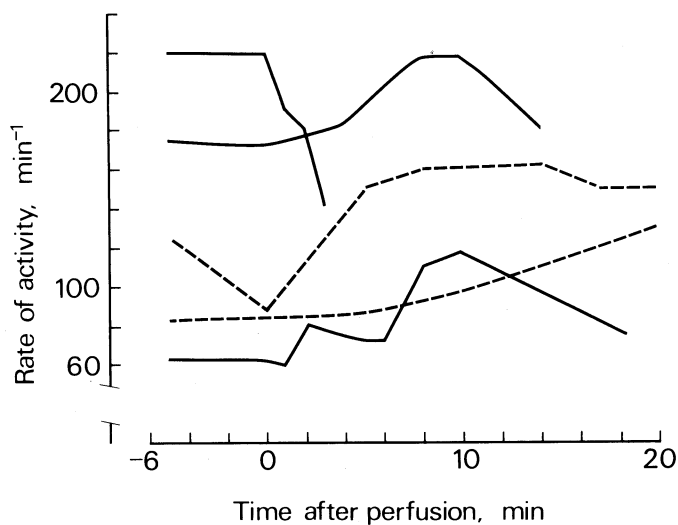
孵卵 12 日のニワトリ胚より得た培養心室筋細胞は自発活動をくり返している。多くの細胞集団の拍動頻度は 100~160/分であるが、同じ培養皿内にあってもその拍動頻度は細胞群によっては広い範囲で異なっている。したがって、代謝阻害剤の作用は同一細胞集団について測定する必要がある。

Figure 1 は 0.25 mM DNP を含む Tyrode 液を灌流したときの活動電位を連続的に記録した図である。Tyrode 液中では自発性活動電位の頻度は当初は 125/分であるが次第に減少して 84/分になっている。ここで、0.25 mM DNP を含む Tyrode 液を灌流するとき拍動数は増加し、8 分後には 160/分に達する (Fig. 1B)。同一細胞群の別の細胞では DNP 灌流後 20 分においてもなお高いプラトー相を示す活動電位が認められる (Fig. 1C)。ここで、正常 Tyrode 液を灌流して DNP を洗い去ると、拍動数は一過性にさらに増加した後 (Fig. 1D)、ほぼもとの値にもどった。

NaCN は 1.0~2.0 mM の濃度においてその作用がよく観察され、0.12 mM の濃度ではその作用は観察されなかった。異なる 12 日卵から得た別々の細胞群について測定した結果の 5 例を Figure 2 に示す。0.25 mM DNP を灌流すると



**Fig. 1.** Continuous recordings of action potentials during and after perfusion through a culture dish with 0.25 mM DNP. **A**: in standard Tyrode solution. **B**: 8 min after the start of DNP perfusion. **C**: Recording from another cell in the same aggregate as in **A** and **B**, obtained 20 min after the start of DNP perfusion. **D**: 3 min after washout of DNP with the standard Tyrode solution. 12-day-old cell, cultured for 4 days. 36°C.



**Fig. 2.** Time courses of changes in the rate of electrical activities. At the time of 0, the culture dish was perfused with 0.25 mM DNP (broken lines) or 2 mM NaCN (continuous lines). Each record was obtained from the cells of different 12-day-old embryos. 35–36°C.

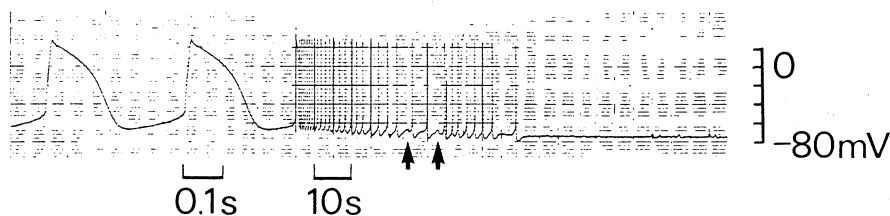


Fig. 3. The shape and the rate of the action potentials preceding the stop of spontaneous activities in 0.25 mM DNP. Arrows indicate the abortive action potentials. 12-day-old cell, cultured for 8 days. 36°C.

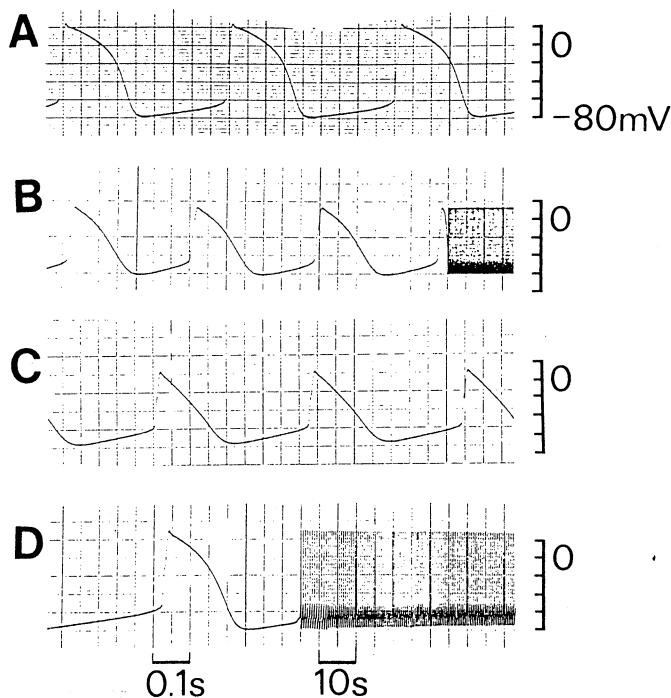


Fig. 4. Continuous recordings of the action potentials during 0.5 mM DNP perfusion to show a fall and disappearance of a plateau. A: in the standard Tyrode solution, B: 6 min, C: 8 min after the start of perfusion of DNP. D: 5 min after washout of DNP with the standard Tyrode solution. 12-day-old cell, cultured for 4 days. 37°C.

活動の頻度は灌流開始約 1 分後から増加し始めその状態は 20 分以上持続する。2 mM NaCN を灌流するときも、活動の頻度は増加して 8～10 分で最大になり以後は減少する。正常 Tyrode 液において高い活動頻度を示す細胞に対しては、NaCN はその活動頻度をかえって減少させた。

DNP 液の灌流中に、活動頻度は一旦増加した後に停止してしまう細胞群があった。Figure 3 は 0.25 mM DNP を含む Tyrode 液を灌流して 11 分後に自動拍動が停止する直前の活動電位を示す。記録の最初において 2 つの活動電位の間隔は 0.37 秒であり 160/分の頻度に当たる。活動電位の間隔は次第に延長して停止に至るが、その経過において、間隔の延長にともなって拡張期電位はさらに負の電位になる。よく見ると、ペースメーカー電位が閾電位に達せず abortive に終わっているのが認められる (Fig. 3 ↑印)。なお、停止の直前に拡張期電位が上昇することはなかった。

## 2. 活動電位の経過に対する作用

活動電位の経過に対する代謝阻害剤の影響を調べるためには同一の細胞から活動電位を 10 分間以上連続して記録することが必要である。すでに示した Figure 1, A と B とを比較すると、0.25 mM

DNP によって活動電位の持続時間が短縮されるのが示されている。この活動電位の短縮またはプラトーの消失は Figure 4 の記録により明瞭に示される。代謝阻害剤を含む Tyrode 液を灌流するとき、拡張期電位レベルが上昇し、活動電位の立ち上がり相が緩徐になり、その振幅が減

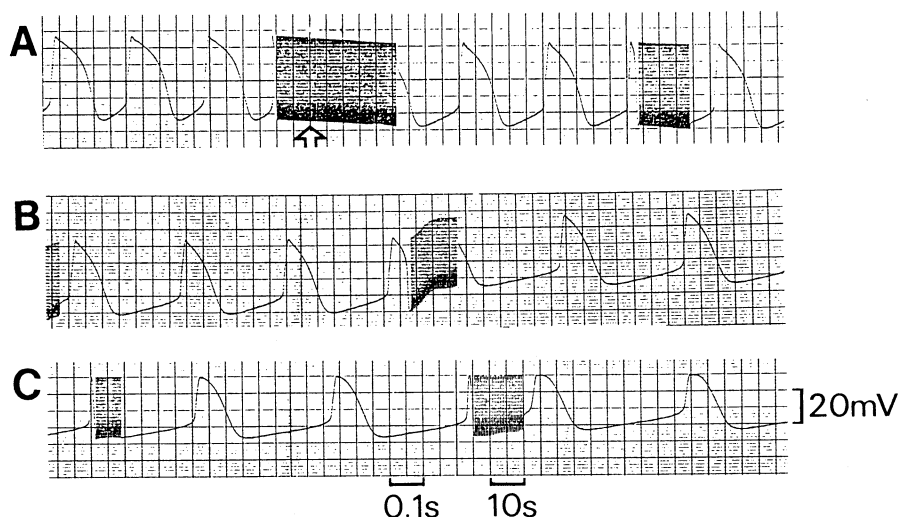


Fig. 5. Continuous recordings of the action potentials during 2 mM NaCN perfusion. A: At the time indicated by the white arrow, the standard Tyrode solution was exchanged for NaCN solution. B: 1 min after and C: 1.5 min after the start of NaCN perfusion. 12-day-old cell, cultured for 10 days. 36°C.

少する。かつプラトーレベルは低下し(Fig. 4B), 遂には消失する(Fig. 4C)。閾電位の変化は明瞭ではない。2 mM  $\text{CN}^-$ を含むTyrode液で灌流するとき、その直後から活動電位の持続時間は短縮しその振幅は減少する。 $\text{CN}^-$ を灌流すると、基線レベルが上昇していく。おそらく、不関電極のAgClに替わってAgCNによる分極電圧が重畳されるためであろう。したがって拡張期電位や閾膜電位の変化を正確に求めることはできなかった。Figure 5は2 mM NaCNによる活動電位の持続時間の短縮、振幅の減少、立ち上がり速度の減少が認められる。この例では、電気的活動の頻度が減少しペースメーカ電位の勾配が緩徐になっており、それにもかかわらず、活動電位の持続時間の短縮されているのが特徴的である。

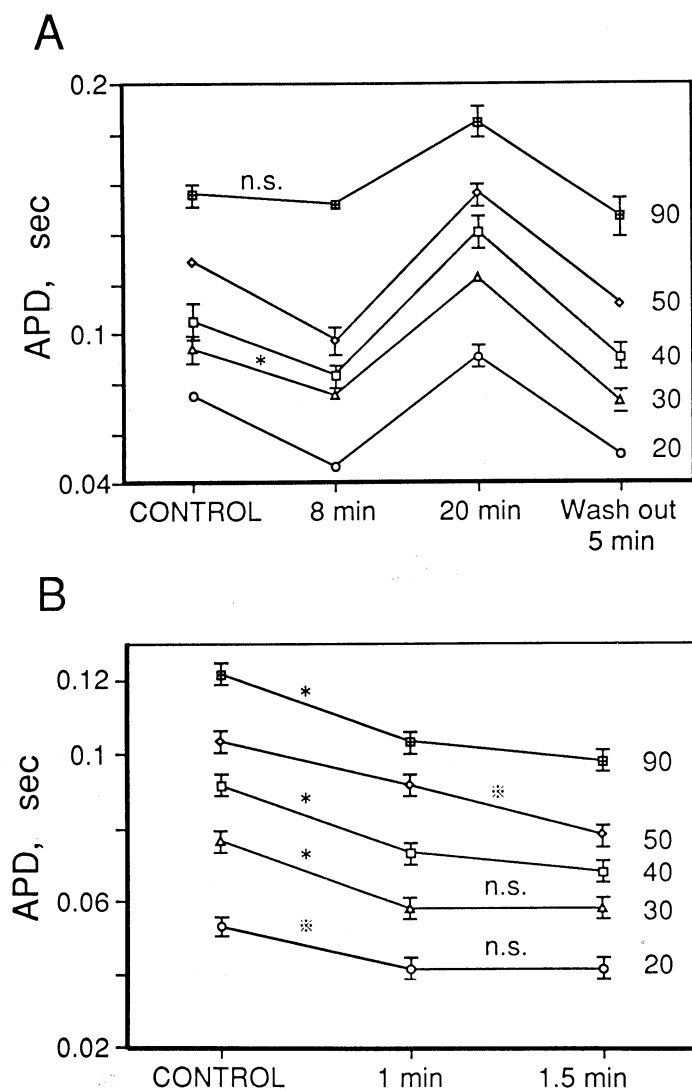
活動電位の高さを10等分し、おのおののレベルにおける持続時間を測定し、活動電位持続時間の短縮を定量的に表現した。Figure 6は0.25 mM DNPおよび2 mM NaCN灌流による活動電位持続時間への影響を示したグラフである。DNPはFigure 1, NaCNはFigure 5で得られた記録よりおのおのの時点で5拍ずつ計測を

行った結果である。DNPとNaCNの両方とも灌流開始後 $\text{APD}_{20-50}$ は有意に短縮した。しかしDNPでは $\text{APD}_{90}$ には有意な短縮はみられなかった。

2 mM NaCNを加えて10分以上経過するとき、振幅が減少するとともに、活動電位の棘(第1相)とプラトー(第2相)とが融合し平坦相の後半が挙上する。ペースメーカ電位は変化しない。拡張期の電位とプラトーとの間を移動するような電位変化、いわゆるall or none repolarizationを示す(Fig. 7)。

## 考 察

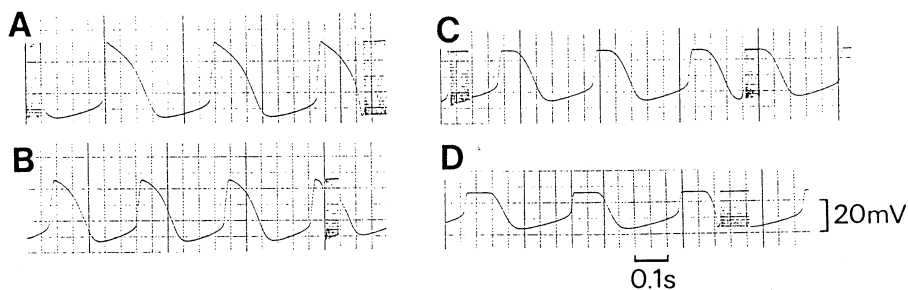
ニワトリ胚より得た培養心室筋細胞の自発性活動電位は同一細胞群においても細胞によってその経過は異なっている<sup>6)</sup>。したがって、代謝阻害剤の活動電位に対する作用は同一細胞について調べられた。その結果、DNPやNaCNは多くの細胞の電気的活動の頻度を増加し、時に減少ないし停止させること、および自発活動電位のプラトー相の持続時間を短縮させることを明らかにした。一般に、活動頻度の増加するとき



**Fig. 6.** Changes in action potential duration during and after perfusion with 0.25 mM DNP (A) and with 2 mM NaCN (B). Action potential durations were measured at the levels of 20, 30, 40, 50 and 90% of the action potential amplitude. The mean  $\pm$  SD is shown by different marks with two short horizontal bars.

□: APD-90, ◇: APD-50, □: APD-40, △: APD-30, ○: APD-20.

Marks \* indicate  $p < 0.01$  and \* indicate  $p < 0.05$  between two points. No mark has been inserted in the case of  $p < 0.001$ .  $n = 5$  in both A and B.



**Fig. 7.** Continuous recordings of the action potentials during 2 mM NaCN perfusion to show an all-or-none repolarization. A: in the standard Tyrode solution, B: 10 min, C: 11 min and D: 14 min after the start of perfusion of NaCN. 12-day-old cell, cultured for 8 days. 36°C.

は、ペースメーカー電位が加速される<sup>7)</sup>。本実験においては、培養心筋細胞においても DNP や NaCN によって電気的活動の頻度が増すとペースメーカー電位の勾配が急峻になることが観察された。このとき、拡張期電位もまた減少する。脱分極とペースメーカー電位の急峻化との原因としては、第一に、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  能動輸送の抑制されることが考えられる。Haas<sup>9)</sup> は  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  輸送の抑制の結果細胞内  $\text{K}^+$  の喪失されることが脱分極の原因であると強調している。ペースメーカー電位は  $\text{K}^+$  の外向き電流、 $I_K$  の減少によって形成される<sup>9)</sup>。細胞内  $\text{K}^+$  の喪失は  $I_K$  の減少を促進する結果をもたらしペースメーカー電位を加速すると考えられる。第二に、 $\text{Ca}^{2+}$  能動輸送の抑制されるためにおこる細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇することも考慮されるべきであろう。すでに、NaCN が細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇をもたらすことは直接に証明されている<sup>10)</sup>。Hagiwara ら<sup>11)</sup> は、洞結節のペースメーカー電位の後半では、 $I_K$  の減少に加えて T 型  $\text{Ca}^{2+}$  電流、 $I_{\text{CaT}}$  の増加が加わることを明らかにしている。細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇は  $\text{Ca}^{2+}$  による起電力を低下し  $I_{\text{Ca}}$  を減少してペースメーカー電位を減速する結果をもたらすことになる。代謝阻害剤によって  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  能動輸送が阻害されれば脱分極と活動数の増加がおこり、 $\text{Ca}^{2+}$  輸送が阻害されれば逆に活動数の減少が起こるであろう。Figure 2 に示されるように、NaCN により拍動数の減少する細胞が存在すること、また Figure 3 に示されるように DNP によって脱分極をおこさないで拍動数の減少ないし停止に至るのは、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  能動輸送の抑制よりも  $\text{Ca}^{2+}$  能動輸送の抑制が顕著に表れた例であると推測される。

細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇に由来する  $\text{Ca}^{2+}$  による起電力の低下は、また活動電位のプラトーを短縮させる原因でもある。プルキンエ線維に直接  $\text{Ca}^{2+}$  を注入するとき活動電位の短縮することが確認されており<sup>12)</sup>、プラトーから再分極に導く  $\text{K}^+$  チャネルの開口が  $\text{Ca}^{2+}$  によって促進されるためと説明されている。この  $\text{K}^+$  チャネルは細胞内 ATP 濃度に感受性があり、ATP 濃度の低下に

よって活性化される。したがって、もし代謝阻害剤によって細胞内 ATP 濃度が減少するならば、 $\text{K}^+$  チャネルの開口が増大して再分極が促進されるであろう。活動電位の持続時間の短縮に関与する要因は、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  能動輸送の抑制に加えて、細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇と  $[\text{ATP}]$  の減少とであると結論できる。

細胞内  $\text{Na}^+$  の蓄積と  $\text{Na}^+$  チャネルの閉口とが活動電位の棘(第 1 相)を消失させ、all-or-none repolarization をつくっている。活動電位の立ち上がり相が緩徐になるとき再分極相もまた遅延することは、他の組織についても示されているところである<sup>1)</sup>。

DNP や NaCN の活動頻度や活動電位の経過に対する作用は可逆的であり、正常 Tyrode 液を灌流してこれらの代謝阻害剤を洗い流すときは完全にもとの状態にもどる。しかし、正常 Tyrode 液を灌流し始めた直後においては一過性に頻度の増大と活動電位の短縮は、さらに促進されプラトーの消失に至る場合がある(Fig. 1)。これは単に  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  能動輸送や  $\text{Ca}^{2+}$  能動輸送、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  交換輸送の抑制からの開放だけでは説明できない。複雑なイオン環境の調節の総和とみなさなければならない。

代謝阻害剤を加えるとき、自発性の活動頻度が増加し、拡張期電位の減少と活動電位持続時間の短縮とが認められた。代謝阻害剤の影響は、生体内においては心筋虚血によっておこる低酸素条件に相当する。実験的に心筋虚血を起こすときは、静止電位の減少、活動電位の持続時間の短縮、オーバーシュートの消失することが既に報告されているところである<sup>13)</sup>。このような電気的活動の減弱は収縮性の減弱をもたらすであろう。田中<sup>14)</sup> は単離心筋細胞に低酸素条件を負荷したとき、Fura-2 AM を指示薬として測定した  $\text{Ca}^{2+}$ -transient が短縮すること、その短縮は刺激頻度が高いときに特に顕著であることを報告した。心筋の代謝阻害が起こるときは、活動電位が短縮しそれとともに  $\text{Ca}^{2+}$ -transient も短縮されて収縮力が減弱され、1 回拍動によるエネルギー消費を減少させることによって、心



筋組織がその障害から防禦されることになる。他方、心筋収縮性の減弱によって起こるであろう循環障害は心拍数の増加によって代償されることになる。このように考えるとき、本研究から得た膜の脱分極と活動電位の短縮とはこれらの循環の維持と心筋細胞の保護とを導く細胞の防禦作用と考えられる。しかし、心拍数が増加することは、それによって  $\text{Ca}^{2+}$ -transient を短縮し収縮力を低下させ、さらに心拍数を増加させる結果を招くという悪循環をもたらし得よう。**Figure 2** に示されたように、最初の活動頻度の高い細胞は阻害剤によって活動頻度の減少が認

められた。代謝阻害剤によって収縮力が減弱され、同時に拍動数を減少することによって、エネルギー消費を節約する意義があると考ええる。心筋虚血に際して収縮力が減弱するとき、心拍数を増加して循環を維持するか、心拍数を減少して心筋を保護するかの決定に際して、本研究の結果は基礎的資料を提供するものであると考え

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費(No. 2-615)の支持によってなされた。附記して深謝します。

## 文 献

- 1) Carmeliet E: Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circ Res* 42: 577—587, 1978
- 2) de Mello WC: Metabolism and electrical activity of the heart: action of 2,4-dinitrophenol and ATP. *Am J Physiol* 196: 377—380, 1959
- 3) Chapman RA: Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Prog Biophys Molec Biol* 35: 1—52, 1979
- 4) Clusin WT: Mechanisms by which metabolic inhibitors depolarize cultured cardiac cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3865—3869, 1983
- 5) Hasin Y, Barry WH: Myocardial metabolic inhibition and membrane potential, contraction, and potassium uptake. *Am J Physiol* 247: H329—H332, 1984
- 6) Matsumura M, Toyota H: Actions of calcium channel blockers on the beating rhythm and membrane potential of cultured chick embryonic heart cells. *Kawasaki Med J* 13: 177—188, 1987
- 7) Weidmann S: *Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser*. Huber, Bern 1956
- 8) Haas HG: Active ion transport in heart muscle in "Electrical phenomena in the heart" ed by de Mello WC. New York, Acad Pr. 1972, pp 163—189
- 9) Brown HF: Electrophysiology of the sinoatrial node. *Physiol Rev* 62: 505—530, 1982
- 10) Eisner DA, Nichols CG, O'neil SC, Smith GL, Valdeomillos M: The effect of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol* 411: 393—418, 1989
- 11) Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M: Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 395: 233—253, 1988
- 12) Isenberg G: Is potassium conductance of cardiac purkinje fibers controlled by  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ? *Nature* 253: 273—274, 1975
- 13) Kardesch M, Hogencamp CE, Bing RJ: The effect of complete ischemia on the intracellular electrical activity of the whole mammalian heart. *Circ Res* 6: 715—720, 1958
- 14) 田中淳二: 単離心室筋細胞における低酸素条件の  $\text{Ca}^{2+}$ -transient に及ぼす影響. *川崎医学会誌* 20: 293—302, 1994